

## Irodalmi áttekintés

Az akut lymphoblastos leukaemia (ALL) a gyermekkor leggyakoribb daganatos megbetegedése, az összes malignus betegség közel egyharmada. Az ALL-es gyermekek gyógyulási eredményei az elmúlt évtizedek alatt jelentős mértékben javultak: ma a túlélési ráta több mint 80%-ra tehető, az alacsony kockázatú csoportban a 90%-ot is meghaladja (Schrappé és mtsai, 2000; Vrooman és Silverman, 2009). Ez a gyógyulási arány igazolja a széleskörű klinikai vizsgálatok alapján kidolgozott *kockázat-specifikus terápiás protokollok* kedvező hatását.

Ugyanakkor a gyógyuló betegek örvendetesen nagy száma mellett a legfőbb problémát ma is a betegek egy részében fennálló terápia rezisztencia, valamint az agresszív kezelés korai és késői mellékhatásai jelentik. A túlélők számának további növelése, a terápia toxikus mellékhatásainak egyidejű csökkentése az individuálisan - lehetőleg a betegség biológiai jellemzőinek megfelelően - megválasztott, kellően, de nem túlzottan agresszív kezeléstől várható. Ehhez már a diagnózis felállításakor el kell különítenünk a jobb és a rosszabb prognózisú eseteket.

Az eltérő prognózisú esetek elkülönítésében számos klinikai és biológiai jellemző van segítségünkre. A legfontosabb prognosztikai tényezők az életkor, a kezdeti fehérvérsejtszám, az immunfenotípus és a diagnózis idején észlelt genetikai eltérések, valamint a kezdeti terápiára adott válasz (Moricke és mtsai, 2005). Kedvező prognosztikai faktor az 1-10 év közötti életkor és a <50 G/L kezdeti fehérvérsejtszám. A folyamat kiterjedtségét tükrözi a hepato-splenomegalia, a mediastinális tumor/nyirokcsomók jelenléte vagy hiánya és a központi idegrendszeri érintettség. A tumor sejtek biológiai tulajdonságaira utalnak a morfológiai és immunológiai jellemzők. A myeloid antigének expressziója a lymphoid blastsejteken kedvezőtlen prognosztikai faktor. A T-sejtes immunfenotípus korábban kedvezőtlen prognosztikai tényezőnek számított, de a kezelés intenzitásának fokozásával a T-sejtes ALL-es gyermekek túlélése hasonlóan alakult a pre-B sejtes leukémiásokéhoz (Goldberg és mtsai, 2003). A leukémiás sejtek szerzett genetikai eltérései –akár gén, akár kromoszóma szintűek– meghatározzák a tumor sejtek biológiai tulajdonságait, más sejtekkel való interakcióját, a leukémia invazivitását, metasztatizáló képességét és a terápiára adott választ. Kimutatásuk ezért közvetlen segítséget nyújt a klinikusnak a diagnózis megerősítésében, a prognózis előrejelzésében és a terápia megválasztásában.

A kezdeti kromoszómalelet prognosztikai jelentőségére gyermekkori ALL-ben elsőként Secker-Walker és mtsai (1978) hívták fel a figyelmet. A kezdeti genetikai eltérés ismerete a klinikai és egyéb biológiai paramétertől függetlenül is lehetővé teszi a jobb és rosszabb prognózisú esetek elkülönítését, azaz a gyermekkori ALL-ben a leukaemiás blastok kezdeti kariotípusa független prognosztikai tényező (Johansson és mtsai, 2004, Moricke és mtsai, 2005).

Az ALL-es gyermekek mintegy 70-75%-ában igazolható kariotípus eltérés hagyományos citogenetikai vizsgálattal (G-sávozás) a diagnózis idején (Pui és Evans, 1998). A kromoszóma aberrációk egy része specifikus szerkezeti eltérés (transzlokáció, deléció), más esetekben számbeli eltérésekkel, kromoszómatöbblettel, vagy hiánnyal találkozunk (Harrison, 2005). A látott leukaemia-specifikus aberrációk összefüggést mutatnak a blast sejtek immunológiai jellemzőivel, diagnosztikai és prognosztikai értéküket számos klinikai és kísérletes eredmény bizonyítja (Schultz és mtsai 2007; Moricke és mtsai, 2008).

### A kariotípus eltérések prognosztikai értéke

A szerkezeti eltérések közül kifejezetten kedvezőtlen kórlefolyással jár a  $t(9;22)(q34;q11)$  transzlokáció (BCR/ABL génátrendeződés), amely a gyermekkori ALL 3-5%-ában mutatható ki, többnyire serdülőkorú gyermekekben. Az *MLL* gén átrendeződését eredményező  $11q23$  aberrációk gyermekkori ALL 5-8%-ában fordulnak elő, CD10 negatív pro-B sejtes ALL-re jellemző. A csecsemőkorban jellemző  $t(4;11)$  kifejezetten rossz prognózissal társul, a hosszú idejű eseménymentes túlélés 10-30%. Az 1 évnél idősebb gyermekeknél ugyanez az eltérés kevésbé kedvezőtlen, mint a csecsemőkorúaknál, de rosszabb az *MLL* átrendeződést nem mutató eseteknél. A prognózist befolyásolja az *MLL* gén transzlokációs partnere: a  $t(4;11)$  és  $t(9;11)$  transzlokációk kedvezőtlenebbek (Pui és mtsai, 2002), mint az egyéb transzlokációk, míg a  $t(11;19)$  transzlokáció T sejtes immunfenotípussal relatíve kedvező kimenetellel társul

(Jakab Zs és mtsai, 2002). Csecsemők esetében a transzlokációs partner nem befolyásolja a prognózist. A pre-B sejtes ALL-re jellemző t(1;19)(q23;p13) az esetek 5-6%-ában fordul elő. Intenzív terápia alkalmazása esetén ez a transzlokáció nem független prognosztikai tényező. Kedvezőtlen a prognózis az immunglobulin gének és a c-myc onkogén átrendeződését okozó B-sejt-specifikus transzlokációk, a t(8;14)(q24;q32) és a variáns transzlokációi jelenlétében. Az intrakromoszómális AML1 amplifikációt (iAMP21) a gyermekkori ALL 1-2%-ában írták le, rossz prognózist jelez (Moorman és mtsai, 2007). A normális kariotípusú betegek egy részében (mintegy 15-30%-ában) a csak molekuláris módszerrel kimutatható t(12;21)(p13;q22) transzlokáció (TEL/AML1 átrendeződés) kedvező prognózisra utal (Forestier és mtsai, 2007). A T-sejt receptor (TCR) géneket érintő transzlokációk közül csak néhánynak ismert a prognosztikai szerepe.

A számbeli eltérések is jelentősek a prognózis szempontjából. Magas hiperdiploiditás (51-65 kromoszómaszám vagy DNS index >1.16) a gyermekkori ALL-es esetek 25-30%-ában igazolható és kedvező kórlefolyást jelez. Többnyire fiatalabb gyermekeknél mutatható ki, alacsony fehérvérsejtszám és prekursor B sejtes immunfenotípus jellemzi. Ezen csoporton belül kifejezetten jó prognózisra utal a 4-, 10-, 17- és 18-as kromoszómák triszómiája és az 1-10 éves életkor. A kromoszómavesztéssel járó hipodiploid (<46) és a közel haploid 823-29) betegeknél kedvezőtlen kórlefolyás várható. Hasonlóan kedvezőtlen a kórlefolyás a komplex kariotípus eltérések esetében (Vrooman és Silverman, 2009).

Az ALL-es gyermekek prognosztikai csoportosítása és a kockázat-(genotípus)-specifikus terápia bevezetése szükségessé tette az újonnan diagnosztizált ALL-es gyermekek kezdeti genetikai eltéréseinek minél pontosabb kimutatását. E célból 1993-ban országos méretű programot indítottunk el a Magyar Gyermekonkológiai Szekció 10 központja közreműködésével azzal a céllal, hogy minden hazánkban diagnosztizált ALL-es gyermek kezdeti genetikai vizsgálata megtörténjen (Oláh és mtsai, 2009).

#### A kezdeti genetikai eltérések kimutatására használt módszerek

A gyermekkori ALL diagnosztizálásában, prognózisának megítélésében és a kezelés megtervezésében a leukémiás blastok genetikai eltéréseinek kimutatása elengedhetetlen a hagyományos morfológiai, citokémia és immunológiai vizsgálatok mellett.

#### *Kromoszómaanalízis*

A modern molekuláris genetikai vizsgálómódszerek birtokában is elsőként a hagyományos citogenetikai analízist (G-sávozás) kell elvégezni. Ezzel a módszerrel egy sejt teljes kromoszóma állományáról kapunk információt egyetlen lépésben. A módszer egy sejt számbeli és szerkezeti kromoszóma aberrációinak felismerésére alkalmas, de segítségével csak a mikroszkóppal látható 5-10 Mb-nál nagyobb méretű eltérések mutathatók ki. Ezért ma már elengedhetetlen a klasszikus citogenetika kiegészítése molekuláris citogenetikai (fluorescens in situ hibridizáció; FISH) és molekuláris genetikai (RT-PCR, Q-PCR) vizsgálatokkal.

#### *FISH*

A FISH analízis során fluorokrómmal jelölt DNS próbát hibridizálunk a vizsgálni kívánt kromoszóma régióhoz. A szekvenciaspecifikus DNS próbák segítségével konkrét számbeli és szerkezeti eltérések mutathatók ki. A módszer nemcsak metafázisú kromoszómákon, hanem interfázisú sejteken is alkalmazható. Nagyszámú interfázisú sejt (200-400) vizsgálata révén különösen alkalmas több sejtvonal felismerésére, illetve a terápia hatékonyságának megítélésére. Hátránya, hogy csak az előzetesen ismert (a konkrétan keresett) vagy a

feltételezett specifikus eltérések detektálására alkalmas. Az eltérő kromoszóma aberrációk kimutatása különböző FISH próbák segítségével történhet.

A centromerspecifikus próbákkal a kromoszómák számbeli eltérései azonosíthatók, a lókuszos specifikus próbák a szerkezeti átrendeződések (transzlokációk, deléciók, amplifikációk) kimutatását szolgálják. A multicolor-FISH (M-FISH) módszer lehetővé teszi mind a 24 kromoszóma különböző színű megjelenítését egyetlen hibridizációs lépésben, ezáltal alkalmas a számbeli és szerkezeti eltérések kimutatására azok előzetes ismerete nélkül. Különösen hasznos a G-sávozással nem azonosítható *marker kromoszómák*, a két vagy több kromoszómát érintő *komplex eltérések* tisztázásában, a *hiperdiploiditáshoz vezető számfeletti kromoszómák* azonosításában és a klasszikus citogenetikai vizsgálattal nem felismerhető *rejtett átrendeződések* azonosításában. Az M-FISH metodikával új, eddig nem ismert transzlokációk azonosíthatók, és pontosíthatók a hagyományos G-sávozással rosszul interpretált szerkezeti kromoszóma átrendeződések.

Munkánk célja: a rendelkezésünkre álló genetikai vizsgálómódszerek alkalmazásával a vizsgálatok optimális algoritmusának kidolgozása, az egyes módszerek indikációjának pontosítása.

1. A hazai Gyermek Onkológiai Centrumokban diagnosztizált ALL-es gyermekek genetikai vizsgálatának M-FISH módszerrel való kiegészítése.
2. Az ALL-es gyermekek teljeskörű genetikai kivizsgálása a hagyományos citogenetika, FISH, RT-PCR és M-FISH módszerek komplementer alkalmazásával, s ezáltal a leukémia specifikus kezdeti genetikai eltérések pontos kimutatása.
3. A kapott eredmények értékelése során az alábbi kérdésekre kerestük a választ:
  - mennyiben nyújt többlet információt az M-FISH technika a jelenleg alkalmazott rutin genetikai módszerek mellett,
  - milyen arányban mutatható ki az M-FISH segítségével az eddig normál kariotípusúnak bizonyult esetekben új leukémia specifikus aberráció,
  - célul tűztük ki a G-sávozással nem azonosítható marker kromoszómák identifikálását, valamint
  - komplex kromoszóma átrendeződések tisztázását.
4. Vizsgálni kívántuk, mennyiben segíti az M-FISH módszer az ALL-es gyermekek egyedi prognosztikai besorolását és a jövőben a terápia individualizálását.

#### Alkalmazott módszerek és eredmények

A DE OEC Gyermekgyógyászati Intézet, Klinikai Genetikai Központ Regionális Genetikai Laboratóriumában történik a debreceni Hematológiai Onkológiai nem önálló Tanszéken, illetve a miskolci Gyermekegészségügyi Központ Hematológiai Osztályán diagnosztizált ALL-es gyermekek teljeskörű genetikai vizsgálata. A genetikai kivizsgálás során a BFM munkacsoport által ajánlott protokollt (Celle, 2004) tekintjük irányadónak. A diagnózis felállításakor a hagyományos citogenetika mellett a legfontosabb prognosztikai értékű transzlokációk (génátrendeződések), t(9;22), t/del 11q23 kimutatására FISH, a t(12;21) FISH és RT-PCR (TEL/AML1 fúziós gén kimutatása) módszereket alkalmazunk. A 2005 és 2008 között diagnosztizált ALL-es gyermekek mindegyikében elvégeztük a protokollban javasolt citogenetikai és FISH vizsgálatokat. A FISH próba panellt (ABL/BCR, TEL/AML, MLL génátrendeződés) kiegészítettük X centromerspecifikus FISH próbával (CEP X) a hiperdiploiditásra gyanús esetek biztosabb kiszűrésére.

A Regionális Genetikai Laboratóriumban 2005 és 2008 között 31 új ALL-es beteg genetikai vizsgálatát végeztük el. Húsz esetet a debreceni Gyermek Onkológiai Centrumban, nyolcat a miskolci Gyermek Onkológia Centrumban diagnosztizáltak; a 28 beteg teljes genetikai kivizsgálása laboratóriumunkban történt; két pécsi és egy budapesti beteg esetében a kiegészítő M-FISH vizsgálatot kérték. A vizsgálatokra minden esetben csontvelő mintából került sor 24 órás tenyésztést és kromoszómapreparálást követően. A betegek klinikai paramétereit az **1. táblázatban**, a citogenetikai és interfázisú FISH vizsgálatok eredményeit a **2. táblázatban** foglaltuk össze.

### **Citogenetika**

A harmincegy ALL-es gyermek mintái közül 23 esetben történt sikeres citogenetikai vizsgálat. hét esetben nem nyertünk értékelhető metafázisokat, míg egy betegtől csak csontvelőkenetet kaptunk, melyen csak FISH vizsgálat elvégzésére volt lehetőség. A kromoszómaanalízis során a 23 sikeres esetből 22 beteg mintáján mutattunk ki klonális kariotípus eltérést. A modális kromoszómaszám alapján egy-egy beteg tartozott a pseudodiploid és a hipodiploid, három beteg az alacsony hiperdiploid (47-50), hét beteg pedig a magas hiperdiploid (51-65) csoportba. ALL-re specifikus kromoszóma eltérést összesen hat esetben azonosítottunk: t(9;22) (n=1), t(1;19) (n=2), t(11;14) (n=1), t(2;8) (n=1) del(11q23)(n=1). Négy esetben több kromoszómát érintő, pontosan nem azonosítható, komplex kromoszóma eltéréseket mutattunk ki.

### **FISH**

A 31 ALL-es gyermek közül 29 mintáján végeztük el a FISH vizsgálatot 4 próba alkalmazásával: LSI BCR/ABL Extra Signal, Dual Color, Dual Fusion; LSI MLL Break Apart Rearrangement; LSI TEL/AML1 Extra Signal Single Fusion; CEP X. Két esetben nem állt rendelkezésünkre vizsgálati anyag. Öt esetben egyik FISH próbával sem igazolódott kromoszómaeltérés, 24 esetben egy vagy több próbával pozitív eredményt kaptunk. A CEP X próba kilenc esetben 1 vagy 2 számfeletti X kromoszómát igazolt, ezek mindegyikében 3-6 AML1 szignál is kimutatható volt, ami a számfeletti X kromoszóma mellett számfeletti 21-es kromoszómák jelenlétére, azaz magas hiperdiploiditásra utalt. A hiperdiploiditást eredményező számfeletti kromoszómák (4, 6, 10, 14, 17, 18, 21, X) közül ugyanis a leggyakrabban jelenlevők az X és a 21-es kromoszóma. A hiperdiploid kariotípusra (>50) két esetben csak a FISH vizsgálat segítségével derült fény a sikertelen kromoszómaanalízist követően.

Az ALL-re specifikus szerkezeti eltérések közül a G-sávozással nem felismerhető t(12;21) transzlokáció hátterében álló TEL/AML1 génátrendeződést kilenc mintán igazoltuk (ez a betegek egynegyede). Hét beteg mintáján a t(12;21) transzlokáció mellett a TEL és AML1 géneket érintő társuló eltéréseket mutattuk ki: két esetben a transzlokációban nem érintett TEL allél delécióját, két esetben a TEL deléciója mellett extra AML1 szignált, két további esetben TEL deléciót és +der(21)t(12;21) fúziós szignált azonosítottunk. Egy esetben a második fúziós jel egy der(X) kromoszómán volt kimutatható. Két beteg mintáján a t(12;21) transzlokáció nem társult egyéb eltéréssel. A TEL/AML1 génátrendeződés során kialakuló fúziós gén kimutatása RT-PCR módszerrel is megtörtént.

Egy esetben a kromoszómaanalízis során észlelt 11q23 (MLL) deléciót FISH break apart próba alkalmazásával megerősítettük.

Egy további betegben a citogenetikai vizsgálattal kimutatott Ph pozitivitást és egy második sejtvonalban a dupla Ph kromoszómát a FISH vizsgálat is megerősítette. Ennél a betegnél mindkét módszerrel több sejtvonal felismerésére került sor.

## **M-FISH**

A pályázat célkitűzésének megfelelően a 2005 és 2008 között újonnan diagnosztizált ALL-es gyermekek rutin genetikai kivizsgálását minden olyan esetben kiegészítettük az M-FISH vizsgálattal, ahol a citogenetikai vizsgálat során értékelhető metafázisokat nyertünk. Ennek elvégzésére a G-sávozással sikeresen vizsgált 23 esetből 21 esetben került sor. Hét alkalommal a kromoszómák rossz morfológiája miatt az M-FISH vizsgálat nem volt értékelhető megbízhatóan. A **3. táblázatban** 18 eset M-FISH vizsgálatának eredményét foglaltuk össze, közülük három beteg citogenetikai vizsgálata 2005 előtt történt. A 18 esetből 14 pre-B, 2-2 érett B-sejtes, illetve T-sejtes immunfenotípusú volt. A nemek aránya: 12 fiú és 6 lány. Az életkoruk 1-17 év között változott, medián életkor 5 év.

A 14 pre-B sejtes esetből klasszikus citogenetikával három esetben ALL-re specifikus szerkezeti eltérést (No. 1-3), három esetben komplex kariotípust (No. 7-9), egy esetben alacsony hiperdiploiditást (No. 11) és hét további betegben magas hiperdiploiditást (No. 12-18) mutattunk ki. Mindkét érett B sejtes esetben specifikus transzlokációt észleltünk (No. 4-5). A T sejtes esetek közül az egyikben specifikus (No. 6), a másikban komplex kariotípus eltérést igazoltunk (No. 10).

A G-sávozással észlelt specifikus transzlokációkat, t(1;19), t(9;22), t(2;8), t(8;14); t(11;14), az M-FISH analízis mind a hat vizsgált esetben (No. 1,2,3,4,5,6) megerősítette, közülük öt esetben az M-FISH további, új információt is nyújtott: az 1 sz. esetben tisztázta a t(1;19)-hez társuló derivált kromoszóma eredetét (der(15)t(1;15)), valamint egy új transzlokációra t(5;12) is fény derült. A Ph pozitív ALL-es esetben (No. 3) egy marker kromoszómát (der(14)t(8;14)) azonosítottunk.

Az érett B sejtes, specifikus (8;14) transzlokációt hordozó esetben (No. 4) társuló eltérésként az 1-es kromoszóma három, eltérő módon átrendeződött formáját észleltük, amely a hagyományos citogenetikai analízis szerint három sejtvonalban jelent meg. Az M-FISH vizsgálat tisztázta, hogy az egyik sejtvonalban a der(1)-es kromoszóma t(1;21) transzlokációból származik, a második sejtvonalban az i(1q)-t megerősítette, míg a harmadik sejtvonalban tisztáztuk, hogy a der(1)-nek vélt kromoszóma az 1-es kromoszóma hosszú karjából és a specifikus transzlokációban érintett derivált 14-es kromoszómából jött létre. Az ebben az esetben észlelt kromoszómaeltérés az érett B sejtes leukémiában előforduló, 1-es kromoszómát érintő jumping transzlokáció ritka formája. A második, érett B sejtes ALL-es esetben (No. 5) a t(2;8) transzlokációhoz társuló derivált kromoszómán az extra sávokat (der(13)t(1;13)), valamint a számfeletti C csoportú (+7) kromoszóma eredetét tudtuk az M-FISH módszerrel pontosítani. A T sejtes ALL-es esetben (No.6) új transzlokációra derült fény (t(3;20)).

A három pre-B sejtes, komplex kariotípusú esetből (No. 7-9) egyben (No.7) az M-FISH megerősítette a citogenetikai leletet. Az 8 sz. esetben a G-sávozással látott négy, szerkezetiileg átrendeződött kromoszóma pontos eredetét tisztázta (der(5)t(5;16), der(12)t(12;15), der(12)t(12;21), del(15q)). A harmadik komplex kariotípusú esetben (No. 9) szintén sikerült azonosítani a derivált kromoszómában résztvevő kromoszómákat (der(X)t(X;21)), valamint tisztáztuk, hogy a dic(8;12)-nek vélt kromoszóma három kromoszóma komplex transzlokációjából származik (der(8)t(8;12;18)). A T sejtes, szintén komplex kariotípusú esetben (No. 10) a nem megfelelő minőségű kromoszóma morfológia miatt G-sávozással markereknek nevezett kromoszómák eredete M-FISH vizsgálattal tisztázódott: i(9q), del(11q). A der(12)-es kromoszómát az egyik sejtvonalban t(12;20) transzlokáció, egy másik sejtvonalban t(12;19) transzlokáció hozta létre.

Egy beteg esetében a citogenetikai vizsgálat alacsony hiperdiploid kariotípust igazolt (No. 11), de a számfeletti kromoszóma eredete G-sávozással nem volt megállapítható. Az interfázisú FISH vizsgálat (12;21) transzlokációt mutatott ki, társuló eltérésként TEL deléciót, dupla fúziós jelet és extra AML1 szignált. M-FISH módszerrel egy 47-es kromoszómaszámú sejtvonal metafázisaiban (12;21) transzlokációban érintett der(12)-es kromoszómát, számfeletti 10-es kromoszómát és del(16q)-t észleltünk.

A kromoszómavizsgálattal magas hiperdiploid csoportba sorolt hét esetben (No. 12-18) az M-FISH vizsgálattal minden számfeletti kromoszómát pontosan azonosítottunk, a derivált (dup(1q)) (No. 12) és az egyik marker kromoszóma (i(7q)) (No. 14) eredetét tisztáztuk. Rejtett szerkezeti átrendeződésre (der(1)t(1;15)) egy esetben derült fény (No. 15), egy további esetben (No. 16) a G-sávozású citogenetikai analízissel látott der(1)t(1;1) szerkezeti átrendeződés az M-FISH vizsgálattal t(1;4) transzlokációnak bizonyult.

Gyermekekori ALL-ben az elmúlt évtizedben elért magas túlélési ráta (>80%) a jelenleg figyelembe vett prognosztikai faktorok (életkor, fehérvérsejtszám, immunfenotípus, kromoszómaeltérések, kezdeti terápiára adott válasz) alapján megválasztott terápiával és/vagy a terápia agresszivitásának növelésével tovább már nem javítható. A betegség kimenetelének javítása, a relapszus megelőzése, a kezelés okozta toxicitás csökkentése új prognosztikai faktorok alkalmazásával és individualizált kezelési stratégiák bevezetésével érhető el. A leukémia patogenetikai hátterének még jobb megismerése lehetővé teszi a betegek pontosabb prognosztikai alcsoportokba való besorolását, ami csak a leukémiás sejtek genetikai eltéréseinek pontos ismeretében lehetséges. Ezzel a céllal egészítettük ki a gyermekekori ALL-es betegek rutin genetikai kivizsgálását (G-sávozás, FISH, RT-PCR) M-FISH vizsgálattal. Eredményeink igazolták, hogy az M-FISH alkalmazásával új, prognosztikai értékű transzlokációk, komplex átrendeződések válhatnak ismertté, amelyek új fúziós gének felismeréséhez vezethetnek. Ez újabb terápiás eljárások alapjául célpontjai lehetnek. Eredményeink alapján megállapíthatjuk, hogy az M-FISH vizsgálat az ALL genetikai jellemzésének fontos, hasznos új információkat nyújtó módszere.

M-FISH vizsgálattal a 18 esetből 16-ban jutottunk többlet információhoz:

- a hiperdiploiditáshoz vezető számfeletti kromoszómák azonosítása mellett társuló, hagyományos citogenetikával nem felismerhető, a prognózist kedvezőtlenül befolyásoló szerkezeti kromoszóma eltéréseket mutattunk ki. Ezen kromoszóma aberrációk azonosítása révén lehetővé válik a hiperdiploid B csoportba sorolt ALL-es gyermekek finomabb prognosztikai besorolása.
- a derivált kromoszómák genetikai összetételének meghatározása révén új, citogenetikával nem azonosított transzlokációkat ismertünk fel
- tisztáztuk a G-sávozással nem azonosítható marker kromoszómák eredetét
- klasszikus citogenetikával nem látott, ún. „rejtett”, átrendeződések kerültek felismerésre
- új sejtvonalakat mutattunk ki
- a két vagy több kromoszómát érintő komplex kariotípus eltéréseket pontosítottunk.

Eredményeink arra utalnak, hogy az ALL-es gyermekek kezdeti genetikai eltéréseinek pontos megállapításában nagyon fontos helye van az M-FISH módszernek. A felismerést új transzlokációk, az ismert rendellenességekhez társuló további genetikai átrendeződések

klinikai, prognosztikai jelentőségének megítéléséhez további esetek tanulmányozása szükséges.

A témában elkészült, de még nem megjelent publikációk:

Bessenyei B, Balogh E, Ujfalusi A, Szegedi I, Oláh É Jumping translocation of 1q associated with good clinical outcome in a case of Burkitt leukemia  
Cancer Genet Cytogenet

Ujfalusi A, Balogh E, Bessenyei B, Kiss Cs, Szegedi I, Bárdi E, Oláh É Novel chromosomal rearrangements detected in children with acute lymphoblastic leukemia by using multicolor fluorescent in situ hybridization  
Cancer Genet Cytogenet





## **Irodalomjegyzék**

Goldberg JM, Silverman LB, Levy DE, et al. Childhood T-cell acute lymphoblastic leukemia: the Dana-Farber Cancer Institute acute lymphoblastic leukemia consortium experience. *J Clin Oncol* 2003; 21:3616-3622.

Harrison CJ, Moorman AV, Barber KE, et al. Interphase molecular cytogenetic screening for chromosomal abnormalities of prognostic significance in childhood acute lymphoblastic leukemia: a UK Cancer Cytogenetic Group Study, *Br J Haematol* 2005 ;129:520-530

Jakab Zs., Balogh E, Karászi É, Kappelmayer J., Kiss Cs., Oláh É.: Variant Translocations of 11q23 in Infant Acute Lymphoblastic Leukemia (ALL); Do Outcomes Differ From t(4;11)? *Med. Pediatr. Oncol.*, 39: 63-65. 2002.

Johansson B, Mertens F, Mitelman F. Clinical and biological importance of cytogenetic abnormalities in childhood and adult acute lymphoblastic leukaemia. *Ann Med.* 2004; 36(7): 492-503.

Moorman AV, Richards M, Robinson HM, et al. Prognosis of children with acute lymphoblastic leukemia (ALL) and intrachromosomal amplification of chromosome 21(iAMP21). *Blood* 2007; 109:2327-2330

Moricke A, Zimmermann M, Reiter A, Gadner H, Odenwald E, Harbott J, Ludwig WD, Riehm H, Schrappe M. Prognostic impact of age in children and adolescents with acute lymphoblastic leukaemia: data from the trials ALL-BFM 86, 90, and 95. *Klin Padiatr.* 2005; 6: 310-20.

Moricke A, Reiter A, Zimmermann et al. Risk-adjusted therapy of acute lymphoblastic leukemia can decrease treatment burden and improve survival: treatment results of 2169 unselected pediatric and adolescent patients enrolled in the trial ALL-BFM 95. *Blood* 2008;111:4477-4489.

Olah E, Balogh E, Pajor L, Jakab Z, and the Hungarian Pediatric Oncology Network; Diagnostic and prognostic significance of initial genetic examination in childhood acute lymphoblastic leukaemia: results of a ten-year study in Hungary (1993-2002) *Pathol. Oncol. Research*, benyújtva, 2009.

Pui CH, Evans WE. Acute lymphoblastic leukaemia. *N Engl J Med.* 1998; 339: 605-615.

Pui CH, Gaynon PS, Boyett JM, et al. Outcome of treatment in childhood acute lymphoblastic leukaemia with rearrangements of the 11q23 chromosomal region. *Lancet* 2002;359:1909-1915.

Schultz KR, Pullen DJ, Sather HN, et al. Risk- and response-based classification of childhood B-precursor acute lymphoblastic leukemia: a combined analysis of prognostic markers from the Pediatric Oncology Group (POG) and Children's Cancer Group (CCG). *Blood* 2007;109:926-935

Secker-Walker LM, Lawler SD, Hardisty RM. Prognostic implications of chromosomal findings in acute lymphoblastic leukaemia at diagnosis. *Br Med J* 1978;2:1529-1530.

Vrooman LM and Silverman LB. Childhood acute lymphoblastic leukemia: update on prognostic factors *Current Opinion in Pediatrics* 2009;21:1-8.



**1. táblázat 2005-2008 között diagnosztizált ALL-es gyermekek klinikai jellemzői**

| <b>Nem</b>              | <b>Esetszám<br/>(n=31)</b> |
|-------------------------|----------------------------|
|                         |                            |
| Fiú                     | 15                         |
| Lány                    | 16                         |
|                         |                            |
| <b>Életkor</b>          |                            |
|                         |                            |
| < 1 év                  | 0                          |
| 1-10 év                 | 21                         |
| > 10 év                 | 10                         |
|                         |                            |
| <b>Kezdeti fvs szám</b> |                            |
|                         |                            |
| < 20 G/l                | 14                         |
| 20-100 G/l              | 12                         |
| > 100 G/l               | 5                          |
|                         |                            |
| <b>Immunfenotípus</b>   |                            |
|                         |                            |
| Pre-B sejtes            | 26                         |
| T sejtes                | 2 + 1*                     |
| Érett B sejtes          | 2*                         |

\*NHL csontvelői érintettséggel



## 2. táblázat Acut lymphoblastos leukémiás gyermekek citogenetikai és FISH vizsgálatának eredményei

| Genetikai vizsgálat eredménye                                   | Citogenetika (n=30) | FISH (n=29)<br>(TEL/AML1,BCR/ABL, MLL, X) |
|---|---------------------|---|
| <b>Normál kariotípus</b>  | 1                   | 5   |
|   |                     |   |
| <b>Számbeli eltérések</b>                                       |                     |   |
| Hipodiploid (< 46)  | 1                   | -   |
| Alacsony hiperdiploid (47-50)                                   | 3                   | -   |
| Magas hiperdiploid (51-65)                                      | 7                   | 9   |
| Pseudodiploid (46+ 1-2 nem spec. szerk.eltérés)                 | 1                   | -   |
|   |                     |   |
| <b>Specifikus szerkezeti eltérések</b>                          |                     |   |
| t(12;21) (p13;q22)  | -                   | 9   |
| t/del(11;v)(q23;v) MLL génátrendeződés                          | 1                   | 1   |
| t(9;22) (q34;q11)   | 1                   | 1   |
| t(1;19) (q23;p13)   | 2                   | -   |
| t(11;14)(p13;q11)   | 1                   | -   |
| t(2;8)(p12;q24)   | 1                   | -   |
| Komplex kariotípus (>2 kromoszómát érintő szerkezeti eltérések) | 4                   | -   |
| Egyéb   | -                   | 4*  |
|   |                     |   |
| <b>Sikertelen</b>   | 7                   |   |
| <b>Nem történt citogenetikai vizsgálat</b>                      | 1                   | -   |
| <b>Nem történt FISH vizsgálat</b>                               | -                   | 2   |

\*Az alkalmazott FISH próbákkal nem specifikus eltérést mutató szignálmintázat

### 3. táblázat. ALL-es gyermekekben végzett genetikai vizsgálatok, citogenetika, FISH és M-FISH eredményei

| Eset No | Nem Kor      | Immun-fenotípus | Kariotípus (G-sávozás)  | M-FISH kariotípus   | FISH                             |
|---------|--------------|-----------------|---|---|----------------------------------|
| 1.      | lány<br>2 év | pre B           | 46,XX,t(1;19)(q32;p13)/<br>46,XX,t(1;19)(q32;p13),add(13q)/<br>46,XX  | 46,XX,t(1;19)(q32;p13), <b>t(5;12)(q21?;p11?)/</b><br>46,XX,t(1;19)(q32;p13), <b>der(15)t(1;15)/</b><br>46,XX                           | normál<br>panel*                 |
| 2.      | lány<br>5 év | pre B           | 46,XX,t(1;19)(q23;p13),der(15)t(1;15)   | 46,XX,t(1;19)(q23;p13),der(15)t(1;15)/<br>46,XX   | normál<br>panel*                 |
| 3.      | fiú<br>3 év  | pre B           | 46,XY,-8,t(9;22)(q34;q11),-14,+2mar/<br>47,XY,-8,t(9;22)(q34;q11),-14, +2mar,<br>+Ph/46,XY                      | 47,XY,del(8),t(9;22)(q34;q11), <b>der(14)</b><br><b>t(8;14)(q11?;q32?),+Ph</b>  | BCR/ABL poz./<br>BCR/ABL poz. 2x |
| 4.      | fiú<br>13év  | érett B         | 46,XY,+der(1),t(8;14)(q24;q32),-21/<br>47,XY,+i(1)(q10),t(8;14)(q24;q32)/<br>46,XY,+der(1),t(8;14)(q24;q32),-14 | 46,XY,+ <b>der(21)t(1;21)</b> ,t(8;14)(q24;q32)/<br>47,XY,+i(1)(q10),t(8;14)(q24;q32)/<br>46,XY,+ <b>der(14)t(1;14)t(8;14)(q24;q32)</b> | IGH/MYC poz.                     |
| 5.      | fiú<br>8 év  | érett B         | 46,XY,t(2;8)(p12;q24),add(13)/<br>47,XY,t(2;8)(p12;q24),add(13),+C/<br>46,XY                                    | 46,XY,t(2;8)(p12;q24), <b>der(13)t(1;13)/</b><br>47,XY,t(2;8)(p12;q24), <b>der(13)t(1;13),+7/</b><br>46,XY                              | nem történt                      |
| 6.      | fiú<br>5 év  | T sejtes        | 47,XY,+8,t(11;14)(p13;q11)/46,XY  | 47,XY, <b>t(3;20)</b> ,+8,t(11;14)(p13;q11)/46,XY   | + 8                              |

\* FISH panel: BCR/ABL, TEL/AML1, MLL, X próbák

Jelmagyarázat: Piros színnel az M-FISH vizsgálattal kapott új információt jelöltük.

| Eset No | Nem Kor      | Immun-fenotípus | Kariotípus (G-sávozás)   | M-FISH kariotípus  | FISH  |
|---------|--------------|-----------------|--|--|---|
| 7.      | fiú<br>2 év  | pre B           | 46,XY,del(1)(q11qter),der(12)t(1;12)(q31;p13);der(12)ins(12;1)(p12;q11q25) | 46,XY,del(1)(q11qter),der(12)t(1;12)(q31;p13);der(12)ins(12;1)(p12;q11q25)                     | TEL del   |
| 8.      | lány<br>5 év | pre B           | 45,XX,der(5),del(5q),der(12),-15,der(16)/46,XX                             | 45,XX,t(5;16),der(12)t(12;15),der(12)t(12;21),del(15q),-21                                     | TEL/AML1 poz.<br>AML1 del                             |
| 9.      | lány<br>7 év | pre B           | 47,XX,+der(X),der(12)(t(12;21)(p13;q22)/47,XX,idem,dic(8;12)               | 47,XX,+der(X)t(X;21)(p21;?),der(12)t(12,21)(p13;?)/<br>46,XX, idem, der(8)t(8;12;18),-12       | TEL/AML1 poz.<br>dupla fúziós jel                     |
| 10.     | fiú<br>5 év  | T sejtes        | 44-45,XY,-8,-9,-11,-12,-D,+3-4mar/46,XY                                    | 45,XY,i(9q),del(11q),der(12)t(12;20)-20/<br>45,XY,i(9q),del(11q),der(12)t(12;19),-19/<br>46,XY | + ABL<br>TEL del                                      |
| 11.     | fiú<br>7 év  | pre B           | 47-48,XY,+1-2mar/46,XY   | 47,XY,+10,der(12)t(12;21),del(16)  | TEL/AML1 poz.<br>dupla fúziós jel<br>TEL del<br>+AML1 |
| 12.     | fiú<br>4 év  | pre B           | 57-58,XY,+X,der(1),+4,+6,+10,+17,+18,+21/46,XY                             | 56-58,XY,+X,dup(1q),+4,+6,+10,+10,+14,+14,+17,+18,+18,+21,+21                                  | +X<br>+ 2 AML1  |

Jelmagyarázat. Piros színnel az M-FISH vizsgálattal kapott új információt jelöltük.

| No  | Nem<br>Kor   | Immun-<br>fenotípus | Kariotípus (G-sávozás)  | M-FISH kariotípus  | FISH                  |
|-----|--------------|---------------------|---|--|-----------------------|
| 13. | fiú<br>7 év  | pre B               | 53-54,XY/46,XY  | 53-54,XY,+X,+Y,+4,+6,+17,+18,+21,+21                                       | + /+++AML1<br>+X      |
| 14. | fiú<br>17év  | pre B               | 54-56,XY,+X,+4,+6,+10,+17,+17,+21, +21,<br>+mar1,+mar2/46,XY      | 54-56,XY,+X,+4,+6, i(7q),+8,+10,+14,+17,<br>+18,+21,+21                    | + /+++AML1<br>TEL del |
| 15. | fiú<br>17év  | pre B               | 54-57,XY,+X,+X,+1,+4,+6,+8,+10,+14,<br>+17,+18,+21/46,XY          | 56,XY,+X,+X,-Y,+der(1)t(1;15),+4,+6,<br>+10,+14,-15,+16,+17,+18,+18,+21    | +2X<br>+ AML1         |
| 16. | lány<br>4 év | pre B               | 54-57,XX,+X,+X,t(1;1),+4,+6,+8, +10,+14,<br>+17,+18,+21,+21/46,XX | 57,XX,+X,+X,+4,+6,+8,+10, +14,+17,+18,<br>+21,+21/57,XX,idem, der(1)t(1;4) | + 2X<br>+ 2AML1       |
| 17. | lány<br>1 év | pre B               | 51-56,XX,+3,+6,+10,+12?,+16?,+17,<br>+18,+18,+21/46,XX            | 55,XX,+X,+3,+6,+10,+12,+14,+17,+18,+21/<br>46,XX                           | + X<br>+ AML1         |
| 18. | fiú<br>2 év  | pre B               | 50-55,XY  | 55,XY,+X,+Y,+4,+6,+8,+14,+17,+18, +21                                      | + X<br>+ AML1         |

Jelmagyarázat: Piros színnel az M-FISH vizsgálattal kapott új információt jelöltük.